

· 热点评述 ·

小RNA, 大本领: 22 nt siRNAs在植物适应逆境中的重要作用

武亮^{1*}, 戚益军^{2*}

¹浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058; ²清华大学生命科学学院植物生物学研究中心, 北京 100084

摘要 RNA是传递生命遗传信息的重要介质。依据RNA是否编码蛋白质, 可分为编码RNA和非编码RNA。作为非编码RNA的核心种类之一, 小RNA在各种生命活动中均发挥重要调控作用, 其产生及功能发挥依赖于不同的DCL、RDR和AGO蛋白。目前, 植物中功能和调控方式较为明确的是以21 nt为主的miRNA和24 nt siRNA, 其它长度和类型的小RNA由于积累水平通常较低, 尚知之甚少。近日, 南方科技大学郭红卫团队发现, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)在缺氮等逆境胁迫下可产生大量依赖于DCL2和RDR6的22 nt siRNA。22 nt siRNA与AGO1结合形成效应复合物, 抑制硝酸还原酶基因(*NIA1*和*NIA2*)等mRNA的翻译效率, 从而减少植物在营养缺失条件下的能量消耗。这意味着, 当植物遇到不利环境时, 虽然无法通过移动来逃避逆境, 但可通过诱导产生小RNA, 协调和平衡正常的生长发育与胁迫响应。

关键词 拟南芥, siRNA, 翻译抑制, 环境胁迫

武亮, 戚益军 (2020). 小RNA, 大本领: 22 nt siRNAs在植物适应逆境中的重要作用. 植物学报 55, 270–273.

植物一旦生根发芽, 就不再移动, 而是在原地开花结实, 平凡地度过一生。然而, 植物的一生并不平静, 真可谓“树欲静而风不止”, 它们会遭遇各种各样的环境变化和逆境挑战, 如高温、低温、干旱和营养匮乏等。如何面对和适应不同的环境条件对植物来说是生死攸关的大事。

在植物体内, 除了具有编码蛋白功能的mRNA外, 还存在着多种多样的非编码RNA (non-coding RNA, ncRNA), 其中包括RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 通路中的21–24 nt的小RNA (small RNA, sRNA)。

sRNA通常由一类称为DCL (Dicer-like)的RNase-III型核酸酶切割前体RNA产生, 与AGO (ARGONAUTE)家族蛋白结合形成沉默复合物, 参与靶标基因的表达调控(Song et al., 2019)。植物中表达丰度最高的sRNA包括21 nt microRNA (miRNA)和24 nt siRNA (small interfering RNA)。目前, 对这两类sRNA的作用方式和生物学功能已研究得较为清楚。miRNA通常由DCL1切割其具有发卡结构的前体产

生, 与AGO1结合后以切割靶标mRNA或抑制其翻译的方式调控基因的表达; 24 nt siRNA通常来自转座子和重复序列区域, 它们由RNA依赖的RNA聚合酶RDR2 (RNA Dependent RNA Polymerase 2)合成的双链RNA前体经DCL3加工产生, 在与AGO4结合后通过招募甲基化酶DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2), 介导DNA甲基化, 从而抑制转座子活性和重复序列的转录(Song et al., 2019)。

除了DCL1和DCL3, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中另外2个DCL蛋白(DCL2和DCL4)在特定条件下也可产生其它sRNA。例如, 当植物遇到病毒侵染后, DCL2和DCL4可产生大量病毒来源的21 nt和22 nt siRNAs, 抵御病毒侵染(Deleris et al., 2006)。此外, 长度为22 nt的miRNA剪切靶标RNA, 其切割产物可经RDR6和DCL4进一步加工, 产生次级21 nt siRNA。由于这些次级siRNA首尾相连呈阶段性排布, 因此也被称为phasiRNAs (phased siRNA)。phasiRNA在植物发育中具有重要调控作用(Deng et al., 2018)。

收稿日期: 2020-05-01; 接受日期: 2020-05-02

基金项目: 国家自然科学基金(No.91940301)

* 通讯作者。E-mail: liangwu@zju.edu.cn; qiyijun@tsinghua.edu.cn

al., 2018)。内源22 nt siRNA表达丰度低, 一直被研究者所忽视, 其调控机制和生物学功能迄今未知。

郭红卫团队前期(2015年)在拟南芥中筛选过量表达乙烯信号转导通路重要转录因子基因 *EIN3* (*ETHYLENE INSENSITIVE3*)的抑制子过程中, 发现细胞质核糖核酸外切酶基因 *EIN5* 以及 DExH-box RNA解旋酶基因 *SKI2* (*Super-Killer2*)突变, 可以回补 *EIN3*过量表达造成的发育缺陷; 并进一步证明 *EIN5* 和 *SKI2* 分别介导的细胞质 5'-3' 和 3'-5' RNA降解 (RNA decay) 通路对植物抑制内源基因的沉默非常重要 (Zhang et al., 2015)。当 *EIN5* 和 *SKI2* 基因功能同时丧失时, 两条细胞质RNA降解通路同时受阻, 植物因此积累大量非正常的双向mRNAs (aberrant bidirectional mRNAs), 而植物体内的RDR6能够以这些异常mRNA分子为模板扩增出双链RNA分子, 随后这些双链RNA分子由DCL4和DCL2加工产生大量的内源21 nt及22 nt siRNAs (coding transcript-derived siRNAs, ct-siRNAs)。ct-siRNAs与AGO1结合, 识别并切割正常功能的mRNAs, 造成破坏性的内源基因沉默, 从而导致植物出现多种生长发育缺陷 (Zhang et al., 2015)。由于22 nt siRNA通常会触发次级siRNA的扩增来进一步切割mRNA并增强转录后水平 (post-transcriptional silencing, PTGS) 的沉默效果, 因而他们猜测当两条RNA降解途径同时阻断时, DCL4产生的21 nt ct-siRNAs可能与DCL2产生的22 nt ct-siRNAs存在直接相互竞争, 从而降低RNA降解的破坏力 (Zhang et al., 2015)。但是, 仅阻断一条RNA降解途径会出现什么情况, 以及这些22 nt ct-siRNAs究竟行使哪些生物学功能, 当时并不清楚 (Zhang et al., 2015)。

在上述研究中, 郭红卫团队建立了完善的植物siRNA产生和作用机制的研究系统, 为深入解析植物内源22 nt siRNAs的生物学功能奠定了前期基础。近期, 该研究团队在 *Nature* 杂志上发文, 报道了其最新工作。他们首先发现, 当植物缺失其中任意一条RNA降解通路并抑制DCL4活性后, 即在 *ein5/dcl4* 和 *ski2/dcl4* 双重突变体中, 植物在叶片生长、顶端分生组织发育及色素沉着等方面表现出多种异常性状, 而在 *ein5/dcl2*、*ski2/dcl2* 和 *ein5/dcl2/dcl4* 等突变体中基本正常, 由于DCL4与DCL2在剪切sRNA前体时存在竞争, 且分别加工产生21 nt和22 nt siRNA, 因此猜

测 *ein5/dcl4* 和 *ski2/dcl4* 中发育缺陷可能是由于植物增加了内源22 nt siRNAs的积累所致 (图1A)。他们进一步验证了该设想, 通过高通量测序发现, 与野生型相比, 内源22 nt siRNAs在 *ein5/dcl4* 和 *ski2/dcl4* 突变体中显著增加, 而在 *ein5/dcl2* 和 *ski2/dcl2* 突变体中保持不变, 说明植物内源22 nt siRNAs的增加确实可以导致植物异常 (Wu et al., 2020)。需要指出的是, 这些增加的siRNA并非广泛产生于基因组的众多位点, 而是主要来源于2个硝酸还原酶基因 (*NIA1* 和 *NIA2*), 其丰度达到了22 nt siRNAs总量的近50%, 说明该类siRNA的产生具有基因位点特异性 (Wu et al., 2020)。虽然这一现象背后的机制仍不清楚, 但是 *NIA1* 和 *NIA2* 基因区域积累如此多的22 nt siRNA引起了该研究团队极大的兴趣, 他们随即对这2个特定位点产生siRNA的生物学功能进行了探索。

不同于21 nt siRNA切割靶标基因mRNA, 转录组测序并未发现产生这些22 nt siRNAs的基因表达发生明显变化; 然而通过测定核糖体结合的mRNA显示, 与野生型或引入 *dcl2* 突变的植株相比, *ein5/dcl4*、*ski2/dcl4* 突变体中核糖体结合 *NIA1* 和 *NIA2* 的mRNA丰度显著降低, 说明 *NIA1* 和 *NIA2* 的翻译效率可能受到抑制。免疫印迹分析进一步证实, 22 nt siRNAs确实抑制 *NIA1* 和 *NIA2* 的翻译 (Wu et al., 2020)。而在全基因组水平检测发现, *ein5/dcl4* 与野生型和 *ein5/dcl4/dcl2* 突变体相比, 其核糖体结合mRNA的水平呈现明显下降, 进一步明确了22 nt siRNAs是在翻译水平抑制靶标基因的表达 (图1B)。

鉴于sRNA一般需要与AGO家族蛋白结合发挥功能, 为了探究这类22 nt siRNAs通过与拟南芥中哪个AGO结合发挥翻译抑制作用, 研究团队通过一系列遗传学研究发现, 类似于经典的miRNA, 22 nt siRNAs主要与AGO1 (而非AGO2或AGO4) 结合实现对靶标基因的翻译抑制过程。通过测定AGO1结合的22 nt siRNAs以及体外重组AGO1介导的蛋白抑制复合物等生化实验, 他们进一步证明了AGO1对于22 nt siRNAs抑制翻译的重要性 (Wu et al., 2020)。但该研究发现, 不同于miRNA与AGO1结合介导翻译抑制依赖于内质网膜定位因子AMP1 (*ALTEREDMERISTEM PROGRAM 1*) (Li et al., 2013), 22 nt siRNAs介导的翻译抑制并不需要AMP1的参与 (Wu et al., 2020)。

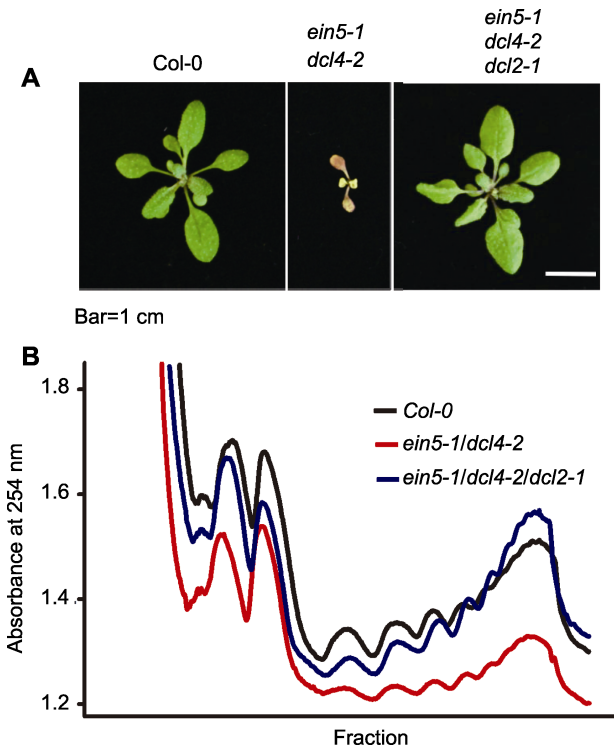


图1 拟南芥 *EIN5* (RNA降解通路关键基因)和 *DCL4* 缺陷的突变体产生大量内源22 nt siRNAs, 造成了多重生长缺陷表型(A)和全局性翻译抑制(B)

Col-0: 野生型拟南芥

Figure 1 *Arabidopsis* RNA decay (*EIN5*) and *DCL4* mutants accumulate endogenous 22 nt siRNAs that cause pleiotropic growth disorders (A) and global translational repression (B)
Col-0: Wild-type *Arabidopsis* plant

生物和非生物逆境可以诱导植物产生新类型的sRNA (Hua et al., 2018)。由于拟南芥 *NIA1*和 *NIA2* 直接参与氮同化过程, 且其基因位点产生了大量22 nt siRNAs, Wu等(2020)观察了野生型植株和 *dcl4* 突变体在缺氮培养基上的表型。与野生型相比, *dcl4* 突变体表现更加敏感。与此一致, *dcl4* 中的 *NIA1*和 *NIA2* 蛋白几乎完全消失, 进一步提示 *DCL4* 的缺失导致 *DCL2* 加工产生更多的22 nt siRNA, 从而严重抑制了 *NIA1*和 *NIA2* 的翻译。结合低氮条件下 *NIA1*和 *NIA2* 的转录水平也显著下降, 这2种水平的协同调控可以保证植物在极端缺氮条件下最大限度地降低氮同化效率, 确保植物减少能耗直至完成整个生活史(Wu et al., 2020)。

*NIA1*和 *NIA2* 作为氮同化过程的关键调控节点, 通过22 nt siRNA介导的翻译水平调控, 不仅有助于维持植物在低氮条件下的生存, 而且在高盐和脱落

酸(abscisic acid)处理等多种非生物胁迫条件下, 可通过暂时抑制植物的生长, 同时激活逆境响应而协调植物生长发育与抗逆反应的平衡(Wu et al., 2020)。在正常条件下, 22 nt siRNA保持低水平的积累, “暗藏杀机”, 当遭遇逆境时, 则“一触即发”, 以保证植物的“生生不息”(图2)。

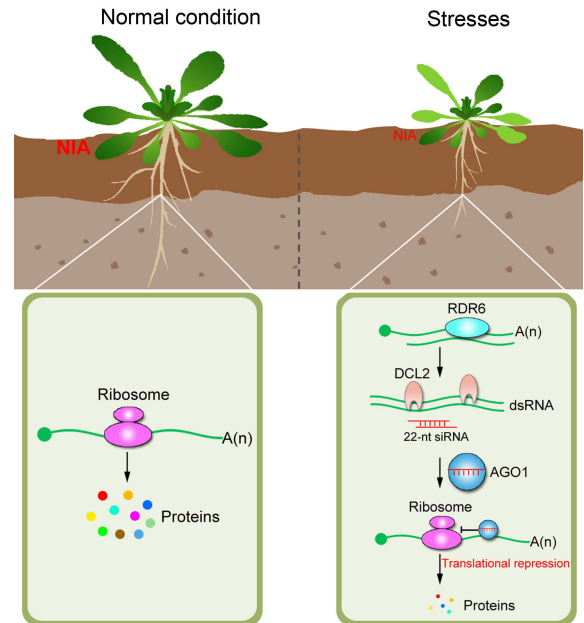


图2 拟南芥22 nt siRNA的工作模式

正常条件下22 nt siRNA几乎不表达, 在氮饥饿等逆境条件下被大量诱导, 进入AGO1沉默复合物, 抑制 *NIA* 等基因的翻译, 平衡植物生长发育与抗逆。

Figure 2 A working model for 22 nt siRNAs in plant stress adaptation

The 22 nt siRNAs are barely accumulated under normal conditions, but can be dramatically induced when plants are exposed to adverse environments. These sRNAs are recruited into AGO1 complex and lead to the translational inhibition of *NIA* genes, thereby balancing plant development and stress tolerance.

目前, 拟南芥仅有少量的基因位点可以产生22 nt siRNA的原因还不十分清楚, 是否有RNA结合蛋白帮助 *DCL2* 识别特异RNA双链产生22 nt siRNA? 22 nt siRNA是否也存在于其它重要农作物中? 它们是否也参与这些植物对环境的应答? 由于sRNA具有细胞非自主性(Hua et al., 2018), 22 nt siRNA是否还可以调控远端器官中的靶标基因? 相信在不久的将来这些问题均可以得到解答。

致谢 本文图1由南方科技大学郭红卫教授提供, 图2由浙江大学秦正睿博士协助绘制, 在此一并致谢。

参考文献

- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O** (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**, 68–71. (Erratum in: *Science*, 2016 351. pii: aaf2336. doi:10.1126/science.aaf2336)
- Deng PC, Muhammad S, Cao M, Wu L** (2018). Biogenesis and regulatory hierarchy of phased small interfering RNAs in plants. *Plant Biotechnol J* **16**, 965–975.
- Hua CL, Zhao JH, Guo HS** (2018). Trans-Kingdom RNA silencing in plant-fungal pathogen interactions. *Mol Plant* **11**, 235–244.
- Li SB, Liu L, Zhuang XH, Yu Y, Liu XG, Cui X, Ji LJ, Pan**

- ZQ, Cao XF, Mo BX, Zhang FC, Raikhel N, Jiang LW, Chen XM** (2013). MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell* **153**, 562–574.
- Song XW, Li Y, Cao XF, Qi YJ** (2019). MicroRNAs and their regulatory roles in plant-environment interactions. *Annu Rev Plant Biol* **70**, 489–525.
- Wu H, Li B, Iwakawa H, Pan Y, Tang X, Ling-hu Q, Liu Y, Sheng S, Li F, Zhang H, Zhang X, Tang Z, Xia X, Zhai J, Guo H** (2020). Plant 22 nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. *Nature* **581**, 89–93.
- Zhang XY, Zhu Y, Liu XD, Hong XY, Xu Y, Zhu P, Shen Y, Wu HH, Ji YS, Wen X, Zhang C, Zhao Q, Wang YC, Lu J, Guo HW** (2015). Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* **348**, 120–123.

Small RNA, No Small Feat: Plants Deploy 22 nt siRNAs to Cope with Environmental Stress

Liang Wu^{1*}, Yijun Qi^{2*}

¹College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

²Center for Plant Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract RNAs can be classified into protein-coding RNAs and non-coding RNAs (ncRNAs). Small non-coding RNAs (sRNAs) are generated by Dicer-LIKEs (DCLs) and RNA Dependent RNA Polymerases (RDRs). They are associated with different ARGONAUTE (AGO) effector complexes and play important regulatory roles in diverse biological processes. 21 nt microRNAs (miRNAs) and 24 nt small interfering RNAs (siRNAs) are the most abundant classes of sRNAs in plants. The mechanisms of their biogenesis and functions are well studied. However, the functions of other less abundant sRNAs remain largely unknown. A recent study from Prof. Hongwei Guo's group at Southern University of Science and Technology showed that a class of 22 nt siRNAs is produced by RDR6 and DCL2 when plants are under certain stress conditions, especially upon nitrogen deficiency. These 22 nt siRNAs are loaded into AGO1 and mediate translational repression of target mRNAs including nitrate reductase structural genes *NIA1/2*, thereby minimizing energy consumption. This work elegantly shows that plants deploy 22 nt siRNAs to achieve a deliberate balance between growth and defense in response to environmental stress.

Key words *Arabidopsis*, siRNA, translational repression, environmental stress

Wu L, Qi YJ (2020). Small RNA, no small feat: plants deploy 22 nt siRNAs to cope with environmental stress. *Chin Bull Bot* **55**, 270–273.

* Authors for correspondence. E-mail: liangwu@zju.edu.cn; qiyijun@tsinghua.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)